

=> s de4023945/pn
L5 1 DE4023945/PN

=> d ab

L5 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX (C) 2003 THOMSON DERWENT
AB DE 4023945 A UPAB: 19931006

Purifcn. of cytokeratin 20 (CK20) comprises (1) prepg. a cytoskeletal fraction from CK20-contg. cells, (2) gel electrophoretic and/or chromatographic sepn. of the proteins in this fraction, then (3) recovering CK20 from the gel or appropriate chromatographic fraction.

Also claimed is a standard protein material (A) made of reconstituted cytokeratin components including CK20 and a basic CK(1-8), or the corresp. alpha-helical central portions of these proteins produced by proteolysis.

Pref. the cytoskeletal fraction is prepd. from duodenal mucosal villi or cultured cells, esp. of colon, bladder or stomach carcinoma.

USE - CK20 is a new cytokeratin (mol.wt. about 46000; isoelectric pt. about 6.1 in 9.5 M urea; partial amino acid sequence reproduced) useful as a marker for particular cell types. Ab raised against CK20 are used to detect and quantify CK20 (or its proteolysis prods.) in tissue sections and homogenates, and in body fluids. The presence of CK20 is used to differentiate carcinoma of the gastrointestinal tract, bladder and to identify the cellular origin of metastases. The standard material (A) is used to detect autoantibodies (AAb) against CK20 in blood and serum (e.g. in immunoassays operating on the displacement principal). AAb can be used to assess the progress of cancer treatment and are also present in certain other diseases, e.g. Crohn's disease.

0/1



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 40 23 945 A 1

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/06
C 07 K 15/28
C 07 K 3/24
C 12 N 5/00
G 01 N 33/50
// C 07 K 3/22, 3/20,
3/14

⑳ Aktenzeichen: P 40 23 945.4
㉔ Anmeldetag: 27. 7. 90
㉕ Offenlegungstag: 30. 1. 92

DE 40 23 945 A 1

⑦1 Anmelder:
Progen Biotechnik GmbH, 6900 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑦2 Erfinder:
Moll, Roland, Dr.med., 6915 Dossenheim, DE;
Franke, Werner Wilhelm, Prof. Dr., 6900 Heidelberg,
DE

⑤4 Verfahren zur Reinigung von Cytokeratin 20 und dessen Verwendung zur Erzeugung von Antikörpern

⑤7 In einem Verfahren zur Reinigung von Cytokeratin 20 (CK 20) stellt man eine Cytoskelettfraction aus CK 20 enthaltenden Zellen her, trennt die darin enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch oder/und chromatographisch auf und gewinnt das CK 20 aus dem Gel bzw. der das CK 20 enthaltenden Chromatographie-Fraktion. Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von für CK 20 spezifischen Antikörpern setzt man zur Immunisierung gereinigtes CK 20 ein und erzeugt nach an sich bekannten Methoden dann polyklonale oder monoklonale Antikörper. Diese Antikörper verwendet man zur immunologischen Identifizierung von CK 20 oder seinem durch proteolytische Spaltung erhaltenen α -helikalen Mittelstück auf Gewebeschnitten, in Gewebehomogenaten und in Körperflüssigkeiten.

DE 40 23 945 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Cytokeratin 20, ein Standardproteinmaterial sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung, sowie ein Verfahren zur Herstellung von gegen CK 20 gerichteten Antikörpern und die Verwendung eines Antikörpers, der für CK 20 spezifisch ist zum Nachweis dieses Proteins auf Gewebeschnitten, in Gewebehomogenaten und Körperflüssigkeiten, sowie die Verwendung eines Standardproteinmaterials zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CK 20 im Blut oder Serum.

Es wurde festgestellt, daß die Intermediär-Filament (IF)-Proteine der Cytokeratin-Familie wirksame Marker für die Analyse der Art und des Differenzierungszustands von Epithelzellen sind. Die epithelialen Cytokeratine, umfassend eine Familie von mindestens 19 verschiedenen Polypeptiden, werden in verschiedenen Kombinationen, abhängig vom Verlauf der Zelldifferenzierung, exprimiert. Die Synthese von Cytokeratinen wird im allgemeinen aufrechterhalten während der malignen Transformation, und diese Tatsache könnte als eines der Nachweiskriterien von Epithel-abgeleiteten Tumoren, einschließlich Tumoren des Blasentraktes, dienen. Es bestand u. a. ein Bedürfnis nach einer leicht durchführbaren und sicheren Nachweismethode zur Feststellung der Lokalisierung des Primärtumors von Metastasengewebe, so daß gegen diesen Primärtumor effektiv vorgegangen werden kann. Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, eine Möglichkeit bereitzustellen, die Unterscheidung verschiedener Tumorzellarten ebenso wie den Herkunftsnachweis für verschiedene Metastasengewebe leicht und möglichst exakt führen zu können.

Es wurde nun ein neues Cytokeratin identifiziert, das nur in bestimmten Zellen vorkommt und damit als Marker zur Unterscheidung bestimmter Zellen und Gewebe dienen kann. Es wurde Cytokeratin 20 genannt.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Reinigung von Cytokeratin 20, bei dem man eine Cytoskelettfraktion aus CK 20 enthaltenden Geweben oder Zellen herstellt, die darin enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch oder/und chromatographisch auftrennt und das CK 20 aus dem Gel bzw. der das CK 20 enthaltenden Chromatographiefraktion gewinnt.

Das Protein CK 20 hat ein Molekulargewicht von ca. 46 000, einen isoelektrischen Punkt in 9,5 mol Harnstoff von ~6,1 und ist etwas saurer als die nicht-phosphorylierte Variante von CK 8. Fig. 1 zeigt eine partielle Aminosäuresequenz von CK 20 (dort bezeichnet IT; A – D erhalten aus Fragmenten von CK 20 nach Verdauung mit Staphylococcus V8 Protease).

Erfindungsgemäß ist es möglich, das Cytokeratin 20 in einer so reinen Form zu erhalten, daß damit z. B. spezifische Antikörper hergestellt werden können. In einer Ausführungsform der Erfindung stellt man die Cytoskelettfraktion aus Duodenalschleimhautzotten, insbesondere von menschlichem Gewebe her. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung gewinnt man die Cytoskelettfraktion aus Kulturzellen, wobei Kulturzellen bevorzugt sind, die aus Kolonkarzinomen, Blasenkarzinomen oder Magenkarzinomen abgeleitet sind. Bei der Durchführung einer Gelelektrophorese wird in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung eine erste SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einem Puffersystem mit erhöhter Salzkonzentration durchgeführt, danach wird die CK 20 enthaltende Bande ausgeschnitten und das Protein daraus eluiert und eine zweite Polyacrylamidgelelektrophorese in einem Puffersystem mit niedriger Salzkonzentration durchgeführt und aus der entsprechenden Bande im Gel das nunmehr gereinigte CK 20 isoliert.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, nämlich der Auftrennung auf chromatographischem Wege, führt man zuerst eine Anionenaustauschchromatographie und dann eine Phasenumkehr-HPLC-Chromatographie durch. Hierbei ist es wiederum bevorzugt, die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose in Anwesenheit von Harnstoff und unter Verwendung eines Eluens mit linearem Gradienten von zwischen 0 und 100 mmol/l Guanidiniumhydrochlorid durchzuführen und die CK 20 enthaltenden Fraktionen in der Folge der HPLC zu unterwerfen. Vorzugsweise unterwirft man dabei die Fraktionen, enthaltend 38 bis 50 mmol/l Guanidiniumhydrochlorid, der HPLC.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Standardproteinmaterial, das aus einem rekonstituierten Cytokeratinkomplex, enthaltend CK 20 und ein basisches Cytokeratin aus der Gruppe der Cytokeratine 1 bis 8, oder aus den durch proteolytische Spaltung hergestellten entsprechenden α -helikalen Mittelstücken dieser Proteine besteht. Hierbei ist es bevorzugt, daß das Standardproteinmaterial aus einem Komplex, enthaltend CK 20 und CK 8, bzw. deren α -helikale Mittelstücke, besteht.

Ein derartiges Standardproteinmaterial ist ein geeignetes Mittel zum Einsatz in immunologischen Tests, beispielsweise unter Anwendung des Verdrängungsprinzips oder sonstiger konkurrierender Immunoassays durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Standardproteinmaterials, enthaltend CK 20 und ein basisches Cytokeratin, bei dem man gereinigtes CK 20 und ein gereinigtes basisches Cytokeratin aus der Gruppe der Cytokeratine 1 bis 8 im equimolaren Verhältnis gemeinsam in einem harnstoffhaltigen Puffer löst und die Mischung zuerst gegen einen Harnstoff und DTT enthaltenden Puffer, dann gegen einen Puffer ohne Harnstoff dialysiert. Durch dieses Verfahren wird ein rekonstituiertes Filamentmaterial erhalten, das sich bildet bei der Entfernung von Harnstoff aus dem Puffer. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung spaltet man nachfolgend der Herstellung des Standardproteinmaterials den gebildeten Cytokeratinkomplex proteolytisch. Hierdurch werden die α -helikalen Mittelstücke des rekonstituierten Standardproteinmaterials erhalten. Diese proteolytische Spaltung wird vorzugsweise mit Chymotrypsin und in einem Enzym zu Substratverhältnis von 6 : 1000 bis 10 : 1000 und mit Verdauungszeiten zwischen 30 und 60 Minuten durchgeführt.

Erfindungsgemäß ist es besonders bevorzugt, als basisches Cytokeratin bei der Herstellung des Standardproteinmaterials CK 8 zu verwenden. Wiederum bevorzugt ist es, ein gereinigtes CK 20 zu verwenden, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt wurde. In wiederum einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung löst man zur Herstellung eines Standardproteinmaterials die Proteine in einem 8,5 bis 10 mol/l

Harnstoff und 1,5 bis 3 mmol/l DTT enthaltenden Puffer und führt die erste Dialyse gegen einen 3,5 bis 4,5 mol/l Harnstoff und 1,5 bis 3 mmol/l DTT enthaltenden Puffer durch.

Ein wiederum weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von für CK 20 spezifischen Antikörpern, bei dem man zur Immunisierung geeigneter Tiere gereinigtes CK 20 einsetzt und nach an sich bekannten Methoden dann polyklonale oder monoklonale Antikörper erzeugt. Die prinzipielle Erzeugung von polyklonalen Antikörpern ebenso wie von monoklonalen Antikörpern ist dem Fachmann bekannt und die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beispielsweise von Köhler und Milstein in Nature 256 (1975) 495 - 497 beschrieben. Vorzugsweise werden mit dem gereinigten CK zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern Meerschweinchen immunisiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung setzt man erfindungsgemäß gereinigtes CK 20 ein.

Um tatsächlich auch bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern monospezifische Antikörper, die gegen CK 20 gerichtet sind, zu erhalten, ist es wiederum erfindungsgemäß bevorzugt, zur Isolierung dieser monospezifischen Antikörper die Immunglobulinfraktion einer Immunpräzipitation und Abtrennung von gegen andere Cytokeratine gerichteten Antikörpern oder/und einer Immunpräzipitation und Abtrennung der für CK 20 spezifischen Antikörper zu unterwerfen. Hierbei sind alle dem Fachmann bekannten Immunpräzipitationen geeignet, und es wird letztendlich ein Antikörper erhalten, der lediglich mit CK 20 immunologisch reagiert. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung führt man die Immunpräzipitation und Abtrennung der für CK 20 spezifischen Antikörper durch Inkubation der aus dem Versuchstier erhaltenen Immunglobulinfraktion mit einer festen Phase durch, an die CK 20 gekoppelt wurde. Bei der Immunpräzipitation und Abtrennung von gegen andere Cytokeratine gerichteten Antikörpern führt man vorzugsweise eine Inkubation der erhaltenen Immunglobulinfraktion mit einer festen Phase durch, an die elektrophoretisch aufgereinigte Cytokeratine 8, 18 und 19 oder Gesamtprotein aus diese enthaltenden Zellen gekoppelt wurde. Erfindungsgemäß werden die Immunpräzipitationsschritte vorzugsweise mehrfach durchgeführt, so daß auch tatsächlich sämtliche nicht gegen CK 20 gerichteten Antikörper von den monospezifischen Antikörpern abgetrennt werden. Erfindungsgemäß ist es wiederum bevorzugt, als feste Phase Nitrocellulosestreifen zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Antikörpers, der gegen CK 20 gerichtet ist, zur immunologischen Identifizierung von CK 20 oder seinem durch proteolytische Spaltung erhaltenen α -helikalen Mittelstück auf Gewebeschnitten, in Gewebehomogenaten und in Körperflüssigkeiten. Hierbei ist es wiederum bevorzugt, aus einer Gewebeprobe ein Homogenat zu bilden, die in dem Homogenat enthaltenen Intermediär-Filamentproteine proteolytisch zu spalten und die daraus freigesetzten α -helikalen Mittelstücke in der löslichen Phase abzutrennen und mit Hilfe des Antikörpers zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen.

Eine wiederum bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ermöglicht es, daß in Körperflüssigkeiten wie Blut, Blutserum und Urin die darin enthaltenen löslichen Intermediär-Filamentproteinfragmente mit Hilfe des Antikörpers immunologisch identifiziert und quantitativ bestimmt werden.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung des Antikörpers gegen CK 20 wird es ermöglicht, festzustellen, ob dieses Protein in Geweben, Gewebehomogenaten oder in Körperflüssigkeiten vorhanden ist. Das Vorhandensein dieses Proteins ermöglicht die Unterscheidung von Zellen bzw. Geweben entsprechend dem Vorkommen von CK 20 in bestimmten Geweben. So wird beispielsweise die Unterscheidung von Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes, der Blase und von Merkel-Zellen der Haut von anderen Adenokarzinomen ermöglicht, ebenso wie der Nachweis der zellulären Bestimmung von Metastasen, wobei Metastasen, die möglicherweise an vollkommen unabhängigen Körperstellen gefunden werden, durch den Nachweis des CK 20-Proteins einem Primärtumor der oben genannten Bereiche zugeordnet werden können. Dabei wird es ermöglicht, durch Identifizierung des Primärtumors auf die tatsächliche Tumorquelle therapeutisch einzuwirken, die häufig äußerst schwierig oder überhaupt nicht auffindbar ist nach bisher bekannten Methoden, und damit die Überlebenschancen für den Patienten erheblich zu verbessern. Ein derartiges Verfahren zur Unterscheidung der Adenokarzinome des Gastrointestinaltraktes, der Blase und von Merkel-Zellen von anderen Adenokarzinomen oder der Nachweis der zellulären Abstammung von Metastasen durch Untersuchung auf das Vorhandensein von CK 20 im zu untersuchenden Gewebe mit Hilfe der für CK 20 spezifischen erfindungsgemäßen Antikörper ist daher ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Wiederum ein weiterer Gegenstand ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Standardproteinmaterials zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CK 20 in Blut oder Serum. Autoantikörper gegen CK 20 entstehen beispielsweise bei der z. B. chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren und können als ein Kriterium für den Verlauf der Behandlung gewertet werden. Weiter können solche Autoantikörper auch bei anderen Krankheiten entstehen, z. B. bei Morbus Crohn, wodurch es auch mit Hilfe des Standardproteinmaterials ermöglicht wird, hier einen Hinweis auf eine Erkrankung zu erhärten oder zu widerlegen.

Außerdem kann das Standardproteinmaterial, wie bereits erwähnt, in immunologischen Tests unter Anwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers zum Nachweis von CK 20 eingesetzt werden, wenn beispielsweise ein Immunoassay nach dem Verdrängungsprinzip durchgeführt wird.

Die mit den erfindungsgemäßen Antikörpern oder dem Standardproteinmaterial durchführbaren Immunoassays sind dem Fachmann bekannt und brauchen hier nicht weiter beschrieben werden. Es ist hierbei selbstverständlich, daß der Nachweis über eine wie auch immer geartete Markierung von Antikörper oder Standardproteinmaterial geführt wird, wobei alle bekannten tatsächlichen Testdurchführungen hier möglich erscheinen.

Auch ein Nachweis von Zelläsionen, wie es beispielsweise in der EP-A-00 57 043 beschrieben ist, kann in entsprechender Form mit dem erfindungsgemäßen Antikörper durchgeführt werden. Ebenso kann der erfindungsgemäße Antikörper eingesetzt werden, um ein Verfahren durchzuführen, wie es in der EP-A-00 57 076 beschrieben ist, analog für das Cytokeratin 20. Hierbei wird der erfindungsgemäße Antikörper als der eindeutig immunologisch reagierende Antikörper eingesetzt.

Die folgenden Beispiele sollen in Verbindung mit der Abbildung die Erfindung weiter erläutern.

Fig. 1 zeigt hierbei die partielle Aminosäuresequenz von CK 20-Fragmenten, die durch Verdauung mit Staphylococcus V8 Protease und Auftrennung durch Umkehrphasen-HPLC erhalten wurden. Diese Sequenzen werden verglichen mit den entsprechenden Sequenzen verschiedener menschlicher Typ I-Cytokeratine. Identische Aminosäuren sind hierbei fett gedruckt. Punkte bedeuten Auslassungen, die gemacht wurden, um besser Korrelationen zu zeigen.

Beispiel 1

Herstellung einer Cytoskelett-Präparation

In größerem Maßstab wurde eine Cytoskelettfraktion aus Duodenalschleimhautzotten präpariert. Das tiefgefrorene Zottenmaterial wurde aufgetaut, mittels eines Polytron-Homogenisators (Kinematica, Luzern, Schweiz) homogenisiert und mit einem fünffachen Volumen von Puffer A (1,5 mol/l KCl, 0,5% Triton-X-100, 5 mmol/l EDTA, 0,4 mmol/l Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF), 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2) für 20 Minuten unter Rühren in Eis extrahiert. Durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13 000 g, 4°C) und zweifaches Waschen des Sediments (Resuspension mittels eines Dounce-Homogenisators und erneute Zentrifugation) in Puffer B (5 mmol/l EDTA, 0,4 mmol/l PMSF, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2) wurde ein Cytoskelett-Pellet erhalten, das bei -80°C aufbewahrt wurde. In analoger Weise wurden auch Cytoskelettfractionen aus anderen Geweben und Tumoren präpariert; in diesen Fällen wurde das Gewebe vor der Polytron-Homogenisation mit einer Schere oder einem Skalpell in feine Stücke zerschnitten.

Cytoskelettfractionen von Kulturzellen wurden nach einem ähnlichen Schema gewonnen. Die auf dem Boden von Plastikkulturflaschen adhärent gewachsenen Zellen wurden nach Abgießen des Kulturmediums und zweimaligem Abspülen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit einem Gummispatel abgeschabt und in Puffer A extrahiert, darauf mit Puffer B gewaschen (siehe Achtstätter et al., Methods Enzymol. 134 (1986) 355 - 371).

Kulturzellen

Die folgenden etablierten, von menschlichen Karzinomen abstammenden Zellkulturlinien wurden bei den Untersuchungen verwendet:

1. Die Blasenkarzinom-Zelllinien RT-112, RT-4, T-24 und EJ (siehe Moll et al., Am. J. Pathol. 132 [1988], 123 - 144).
2. Mehrere von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogene und wie dort angegeben kultivierte Kolonkarzinom-Zelllinien: HT-29 (ATCC HTB 38; LoVo (ATCC CCL 229; SW 1116 (ATCC CCL 233); LDL-1 (ATCC CCL 221); CoLo 320 DM (ATCC CCL 220).
3. Zellen der menschlichen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurden wie bei Moll und Mitarb., Cell 31 (1982), 11 - 24, beschrieben gezüchtet. In einigen Experimenten wurden Kulturzellen metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert (Franke und Mitarb., Knapp und Franke, Cell 59 [1989], 67 - 79. "Spontaneous losses of control of cytokeratin gene expression in transformed, non-epithelial human cells occurring at different levels of regulation").

Beispiel 2

Präparation von reinem CK 20

Zur Gewinnung von CK 20-Proteinen wurden zwei verschiedene Proteinisoliationsverfahren angewandt. Zum einen wurde die präparative Gelelektrophorese verwendet (Achtstätter und Mitarb., 1986, siehe Beispiel 1), wobei aus Duodenalschleimhautzotten gewonnene Cytoskelett-Proteine in eindimensionaler Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Natriumacetat-Färbung sichtbar gemacht wurden. Die Proteinelution aus den ausgeschnittenen Banden erfolgte entweder elektrophoretisch oder durch Inkubation des fein homogenisierten Gelmaterials in einer 0,05%igen wäßrigen SDS-Lösung. Das eluierte Protein wurde mittels Vakuumdialyse eingengt und mit Aceton gefällt. Als SDS-PAGE-System wurde entweder das Laemmli-System (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680 - 685) oder das Puffersystem mit erhöhter Salzkonzentration (Achtstätter und Mitarb., 1986 (s. o.)) angewendet, in manchen Fällen auch beide sukzessiv.

Als zweite Methode wurde aus gleichem Ausgangsmaterial eine Kombination von DEAE-Zellulose-Anionen-Austauscherchromatographie und "Reverse-phase"-HPLC-Chromatographie verwendet (Achtstätter und Mitarb., 1986 s. o.). Die Reinheit der Proteinfractionen wurde durch SDS-PAGE überprüft. Die chromatographische Methode vermeidet eine SDS-Denaturierung und war daher die Methode der Wahl für in vitro-Komplexbil- und Rekonstitutionsversuche.

Beispiel 3

Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper gegen CK 20

Durch präparative Gelelektrophorese gereinigtes CK 20-Protein wurde zur Immunisierung von Mäusen und Meerschweinchen eingesetzt, wobei das Immunisierungsschema von Franke und Mitarbeitern (Franke, Denk, Kalt und Schmid (1981) Biochemical and immunological identification of cytokeratin proteins in hepatocytes of mammalian liver-tissues. Exp. Cell Res. 131, 299 - 318) zur Anwendung kam. Es konnte ein Antiserum isoliert

werden, das hohe Titer von Antikörpern gegen CK 20-Protein, jedoch auch Antikörper gegen CK 18 enthielt. Aus diesem Serum konnten monospezifische Antikörper gegen CK 20-Protein (ohne Reaktivität mit CK 18) isoliert werden, indem das in PBS mit 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Natriumazid verdünnte Serum (oder eine daraus durch Ammoniumsulfat-Präzipitation hergestellte Immunglobulinfraktion) mehrfach an Nitrozellulosestreifen absorbiert wurde, an welche durch SDS-PAGE aufgetrennte und elektrotransferierte Cytokeratine 8, 18 und 19 aus MCF-7-Zellen oder MCF-7-Zell-Gesamtprotein gebunden worden waren. Die Absorption erfolgte jeweils durch 30-minütige Inkubation in einem Foliensäckchen unter ständigem Drehen. Zwischen den Absorptionsschritten wurden die Nitrozellulosestreifen durch Inkubation in 3 mol/l KSCN in PBS und anschließendes Waschen in PBS regeneriert. Es wurden sukzessive etwa vier bis acht Absorptionsschritte durchgeführt. In manchen Versuchen wurde vor dieser Gegenabsorption ein positiver Affinitätsreinigungs-Schritt an Nitrozellulose-Streifen mit SDS-PAGE-getrenntem CK 20-Protein durchgeführt; dabei wurden die an diese Streifen gebundenen Antikörper mittels 3 mol/l KSCN in PBS eluiert und gegen PBS vakuumdialysiert (Krohne und Mitarb., J.Cell Biol. 94 (1982) 749 – 754). Die Spezifität der gereinigten Antikörperpräparationen wurde durch Immunblot-Analysen nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung gesichert.

Beispiel 4

In vitro-Rekonstitution von heterotypischen Cytokeratinkomplexen und Intermediärfilamenten

Aus Cytoskelettmaterial von Duodenalschleimhaut-Zotten gewonnene, chromatographisch gereinigte Proteine (CK 8, 18 und 20) wurden in einem 10 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), der 2,5 mmol/l DTT und 9,5 mol/l Harnstoff enthielt, gelöst und (nach Abzentrifugation unlöslichen Restmaterials bei 13 000 g) entweder allein oder in bestimmten, annähernd stöchiometrischen Mischungen (CK 8 + CK 18; CK 8 + CK 20) gegen denselben Puffer mit DTT, aber nur 4 mol/l Harnstoff dialysiert. Dadurch sollte eine heterotypische Komplexbildung zwischen Typ I- und Typ II-Cytokeratinen ermöglicht werden. Aliquots der auf 4 mol/l Harnstoff gebrachten Lösung wurden (nach Zentrifugation) direkt als Proben einer Elektrophorese unter nichtdissoziierenden Bedingungen in 4 mol/l Harnstoff unterzogen, kombiniert mit SDS-PAGE in der zweiten Dimension.

Zur in vitro-Rekonstitution von Intermediär-(Cytokeratin)-Filamenten wurde chromatographisch gereinigtes CK 8 und CK 20-Protein jeweils in einer Konzentration von 1 mg/ml (Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford M.M., Anal.Biochem. 72 (1976), 248 – 254) gelöst (Puffer siehe oben) und im equimolaren Verhältnis gemischt. Diese Mischung (und als Kontrollen auch Lösungen der einzelnen Proteine) wurden auf schwimmenden Membranfiltern (Millipore VS 0,025) gegen 4 mol/l Harnstoff in 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6) mit 2,5 mmol/l DTT für eine Stunde dialysiert, anschließend für zwei Stunden gegen 10 mmol Tris-HCl (pH 7,6) mit 2,5 mmol/l DTT, aber ohne Harnstoff. Anschließend wurde eine Negativfärbung und elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt (Quinlan et al., J.Mol.Biol. 178 (1984), 365 – 388).

Beispiel 5

Proteolytische Spaltungsexperimente

Natives Cytoskelettmaterial aus Duodenalschleimhautzotten wurde einer partiellen proteolytischen (chymotryptischen) Spaltung unterzogen (Hatzfeld und Mitarb., J.Mol.Biol. 197 (1987) 237 – 255). Es wurden dabei Enzym Substrat-Verhältnisse von 6,6 : 1000 oder 9 : 1000 und Verdauungszeiten zwischen 30 und 60 Minuten angewendet. Die Spaltprodukte wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung oder Immunblot-Analyse oder mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, verbunden mit tryptischer Peptid-Kartierung, analysiert.

Beispiel 6

Immunocytochemie, verwendete Verfahren für die Immunfluoreszenz

Immunperoxidase und Immunelektronenmikroskopie von kryostatischen Gewebesektionen und Kulturzellen wurden wie beschrieben angewandt (Bader et al., Eur.J.Cell Biol. 47 (1988) 300 – 319; Franke et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, (1978) 5034 – 5038; Franke et al., Exp.Cell Res. 116 (1978) 429 – 445; Franke et al., Eur.J.Cell Biol. 19 (1979) 255 – 268; Franke et al., Exp.Cell Res. 131 (1981) 299 – 318; Franke et al., J.Cell Biol. 90 (1981) 116 – 127; Franke et al., Cell 30 (1982) 103 – 113; Franke et al., Virchows's Archiv A, Pathol.Anat. 411 (1987) 137 – 147; Jahn et al., Differentiation 36 (1987) 234 – 254; Knapp und Franke, Cell 59, (1989) 67 – 79, Moll et al., Am.J.Pathol. 132 (1988) 123 – 144.

Beispiel 7

Verfahren zur Gewinnung eines Standards

Die angewendeten Methoden werden am Beispiel der Cytokeratine beschrieben; die Art der Aufarbeitung kann jedoch auf alle IF-Proteine übertragen werden.

7.1 Reinigung der intakten Polypeptide

Humancytokeratine (z. B. 8) wurden im wesentlichen wie bei Achtstaetter et al., Methods Enzymol. 134:355–371 (1986), beschrieben, aus der Humankulturzelllinie MCF-7 gewonnen. Die abgeschabte Zellschicht wird homogenisiert (im wesentlichen beschrieben bei Achtstaetter et al., supra). Einzelne Cytokeratin-Polypeptide wurden mittels Anionen-Austauschromatographie auf DEAE-Cellulose (DE 52; Whatman Chemical Separation Inc., Clifton, NJ, USA) in einem 8 mol/l, (für Cytokeratin 8) bzw. 9,5 mol/l (für Cytokeratin 20) Harnstoff-Puffer (8 bzw. 9,5 mol/l Harnstoff, 2,5 mmol/l Dithioerythrit, 30 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0)) chromatographisch gereinigt, im wesentlichen wie beschrieben bei Hatzfeld & Franke, J. Cell Biol. 101 (1985) 1826–1841; Achtstaetter et al., 1986 (s. o.); Bader et al., EMBO J. 5 (1986) 1865–1875; Quinlan et al., J. Mol. Biol. 192 (1986) 337–349. Kurz beschrieben, wurde Cytoskelettmateriel für 2 Stunden in 9,5 mol/l Harnstoff (5 mmol/l Dithioerythrit, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0)) extrahiert und der nach Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ (g Gravitationskonstante) erhaltene Überstandextrakt wurde gegen einen 8 bzw. 9,5 mol/l Harnstoff-Puffer dialysiert und auf eine DEAE-Cellulosesäule, die mit diesem Puffer equilibriert wurde, aufgebracht. Gebundenes Protein wurde mit einem 0 bis 100 mmol/l Guanidinium-HCl-Gradienten eluiert. Die Polypeptid-Zusammensetzung wurde durch eine SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) kontrolliert. Die vereinigten Fraktionen wurden einer weiteren Reinigung durch eine Hochdruck-Flüssig-Chromatographie mit Phasenumkehr unterworfen, wobei 0,01% (v/v) Trifluor-Essigsäure (TFA) (Fluka, Buchs, Schweiz) als wäbriges Lösungsmittel A, 0,07% (v/v) TFA in Azetonitril (chromatographische Qualität, Merck Darmstadt, BRD) als organische Phase (Lösungsmittel B) und eine BioRad-RP-304-Säule mit Phasenumkehr (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) verwendet wurden. Die Peakfraktionen wurden gesammelt, das Azetonitril durch Vakuumverdampfung entfernt und die Fraktionen gefriergetrocknet.

7.2 Rekonstituierung der gereinigten Polypeptide zu Protofilamenten und IF-Proteinen

Die gereinigten Cytokeratine wurden in Puffer, der 9,5 mol/l Harnstoff enthält, gelöst. Äquimolare Mengen an Typ I und Typ II Cytokeratin wurden bei einer Endkonzentration von etwa 0,5 mg/ml gemischt und die Protofilamente und Cytokeratinfilamente wurden erhalten, indem die Polypeptidlösung gegen Puffer niedriger Ionenstärke dialysiert wurde. (Es wurden die Puffer, die bei Hatzfeld, M. und Franke, J. Cell Biol. 101: 1826–1841 (1985) beschrieben sind, verwendet.) Die Bildung von Protofilamenten und Cytokeratinfilamenten wurde elektronenmikroskopisch durch Negativ-Kontrastierung der Probe kontrolliert (vergleiche Hatzfeld und Franke, supra).

7.3 Darstellung α -helikaler Cytokeratin-Mittelstücke durch limitierte Proteolyse

Der proteolytische Abbau wurde mit verschiedenen Proteasen durchgeführt. In einer typischen Präparation wurden Chymotrypsin (EC 3.4.21.1 aus Rinderpankreas, z. B. von der Fa. Sigma, München) in einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis (Gewicht/Gewicht) von 6,6 : 1000 für das Cytokeratin 8 : 18 Paar und im Verhältnis 9 : 1000 für das Cytokeratin 8 : 20 Paar eingesetzt. Für jede Chymotrypsin-Charge mußte die Abbauprodukte kontrolliert und für den maximalen Anteil an stabförmigen Mittelstücken ($M_r = 38\,000 - 40\,000$) optimiert. Das Optimum liegt bei ca. 20 min bei 30°C. Nach der entsprechenden Abbauprodukte wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid gestoppt.

7.4 Reinigung der α -helikalen Mittelstücke

Die proteolytischen Mittelstücke und deren einfache Fragmente wurden entweder chromatographisch auf einer Sepharose CL6B (Pharmacia LKB, Freiburg) Säule oder direkt über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie getrennt, und zwar auf einer BioRad RP304-Säule mit Phasenumkehr unter Verwendung des im obigen Abschnitt 7.1 beschriebenen Lösungsmittelsystems. Zur weiteren Reinigung wurden die Hauptfraktionen mit Lösungsmittel A zur Reduzierung der Azetonitril-Konzentration auf ca. 20% (v/v) verdünnt und dann direkt auf eine My-Bondapak C18-Säule mit Phasenumkehr (Waters Associates, Milford, MA) aufgebracht. Alle Hauptfraktionen wurden lyophilisiert und die Proben mittels 1- und 2-dimensionaler Gelelektrophorese auf Anwesenheit der α -helikalen Mittelstücke, die zum Teil einfach geteilt sind zu jeweils zwei Mittelstückfragmenten, da die Schnittstelle an einem kurzen mittleren Abschnitt, an dem die helikale Struktur unterbrochen ist, liegt, wurden als Referenzmaterial bzw. Standardmaterial für die Eichung des Nachweissystems und für Immunisierungen eingesetzt.

Beispiel 8

Auswahl und Herstellung geeigneter Antikörper

Spezifische Antikörper gegen Intermediärfilamentproteine, sowohl eigene Entwicklungen als auch kommerziell erhältliche, wurden auf ihre Immunreaktivität mit den α -helikalen Mittelstückfragmenten, wie sie als Standardmaterial nach Beispiel 7 gewonnen wurden, untersucht mit folgenden Methoden:

8.1. Immunblot (Western-Blot; Reaktion mit denaturiertem Antigen)

Gereinigte Fragmentproteine (z. B. Cytokeratin 8 : 18-, Cytokeratin 8 : 20- oder Vimentin-Fragmente) und Cytoskelett-Präparationen aus Gewebeproben (z. B. Lymphknoten oder Leber) vor und nach proteolytischer Verdaureaktion mit Chymotrypsin (vergleiche Beispiel 9) wurden gelelektrophoretisch (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt, die Proteine elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert und mit den in Frage kommenden spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Immunreaktion wurde über markiertes Protein A oder markierte Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Antikörper, die mit den α -helikalen Mittelstücken (M_r 38 000 – 40 000; M_r 20 000 – 22 000 im Falle der basischen Keratine) eine Immunreaktion zeigten, wurden ausgewählt.

8.2 Dot-Blot (Reaktion mit nativem bzw. renaturiertem Antigen)

Ca. 2×10^{-6} g gereinigte CK 20-Proteine (gelöst in 50×10^{-6} l 50 mmol/l Na_2HPO_4 -Puffer, pH 7,4) bzw. Überstandsfractionen von homogenisierten Gewebeproben nach Chymotrypsinverdaue werden direkt an Nitrozellulose gebunden (z. B. in einer SRC 96 Minifold I Dot-Blot-Apparatur von Schleicher und Schuell, Kassel, BRD) und mit den in Frage kommenden, spezifischen Antikörpern inkubiert. Der weitere Arbeitsgang ist wie unter 1. beschrieben.

8.3 ELISA (Reaktion mit nativem bzw. renaturiertem Antigen)

500 ng (10^{-9} g) gereinigte Fragmentproteine (gelöst in 100 μ l (10^{-6} l) 50 mmol/l NaHCO_3 -Puffer, pH 9,6) bzw. 2 μ g (10^{-6} g) (in 100 μ l (10^{-6} l)) Protein der Überstandsfractionen von homogenisierten Gewebeproben nach Chymotrypsinverdaue werden pro Vertiefung in einer 96-Loch Mikrotiterplatte inkubiert und gebundenes Protein mit den in Frage kommenden spezifischen Antikörpern inkubiert. Der weitere Arbeitsgang ist wie unter 1. beschrieben.

8.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Standardmethode, eingehend beschrieben z. B. bei Ciocca D.R. und Bjercke R.J. (1986) in *Methods Enzymol.* 121, 562 – 579.

Antikörper und Antiseren, die nach den o.g. Methoden positiv waren, sind K_s 19.2; K_s 18-9B1; K_s 18 – 27 IV; K_s 8 – 17.2; K_s pan 1 – 8; VIM 3B4; IT-Meerschweinchen Antiserum (Herstellung von Meerschweinchen Antiserum gegen Cytokeratin 20 (siehe Beispiel 3, IT-Maus Antiserum (Herstellung s. Beispiel 3).

8.5 Herstellung monoklonaler, gegen α -helikale Mittelstücke gerichtete Antikörper

Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden nur in vitro rekonstituierte Filamente, die aus den jeweiligen gereinigten Polypeptiden gebildet wurden, zur Immunisierung injiziert. Um monoklonale Antikörper herzustellen, wurden weibliche, 6 – 8 Wochen alte BALB/c Mäuse immunisiert, indem ihnen Cytoskelett-Präparationen oder rekonstituierte Filamente mit $30 - 300 \times 10^{-6}$ g Protein pro Injektion injiziert wurden. Die Antigene wurden in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) suspendiert und für die erste Injektion mit Freund'schem Adjuvans (komplett) emulgiert. Bei allen folgenden Injektionen wurde Freund'sches Adjuvans (inkomplett) verwendet. Die Tiere wurden dreimal im Abstand von etwa drei Wochen subcutan gespritzt, und sie erhielten drei Tage vor der Zellfusion eine intraperitoneale Wiederholungs-Injektion mit $30 - 80 \times 10^{-6}$ g Antigen. Die Milzzellen immunisierter Mäuse wurden mit Maus-Myelomzellen der Linie Sp3/OAg14, X63-Ag8.653 und NSO/U (beschrieben bei Shulmann et al., *Nature* 276: 269 – 270 (1978); Kearney et al., *J. Immunol.* 123: 1548 – 1550 (1979); Clark und Milstein, *Somatic Cell Genetics* 7: 657 – 666 (1981)) im Verhältnis 10 : 1 fusioniert, im wesentlichen wie es bei Koehler und Milstein, *Nature* 256: 495 – 497 (1975) beschrieben wurde.

Die Hybridomüberstände wurden immunfluoreszenzmikroskopisch auf Gefrierschnitten von Human- und Rindergewebe (im wesentlichen beschrieben bei Achtstaetter et al., *Differentiation* 31: 206 – 227 (1986)) oder auf Kulturzellen, die auf speziell beschichteten Objektträgern oder Deckgläschen gezüchtet wurden, getestet oder mit der Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstechnik (ELISA), wobei die gereinigten Antigene zum Beschichten von Mikrotiterplatten eingesetzt wurden. Positive Klone wurden zweimal durch kontrollierte Ausverdünnung subkloniert. Ig-Subklassen wurden nach Ouchterlony und Nilsson, L.A. (1978, in: *Handbook of Experimental Immunology*; Wei ed., vol. 1, chapter 19, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1 – 19) bestimmt.

8.6 Koppeln der Detektor-Antikörper an Peroxidase.

Die als Detektor-Antikörper bezeichneten monoklonalen Antikörper und spezifisches Meerschweinchen-Antiserum wurden nach einem von B. Tijssen (*Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 15: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier Amsterdam, New York, Oxford; S. 238) beschriebenen Verfahren an Peroxidase gekoppelt: 5 mg Peroxidase werden in 0,5 ml Natriumcarbonatpuffer (100 mmol/l, pH 9,2) gelöst und zum Koppeln vorbereitet, indem das Enzym 2 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß mit 0,5 ml einer 10 mmol/l NaIO_4 -Lösung oxidiert wird. Danach wird der gewünschte Antikörper (10 mg gelöst in 2 ml 100 mmol/l Natriumcarbonatpuffer, pH 9,2) zugesetzt, 0,5 g trockenes Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Freiburg) zugegeben und weitere 3 Stunden unter Lichtabschluß inkubiert. Das dabei entstandene Konjugat wird aus dem Sephadex-Material mit dem Natriumcarbonatpuffer eluiert und mit 1/20 Volumteil einer 0,5% NaBH_4 -Lösung in 0,1 mmol/l NaOH gemischt.

30 min. später wird 1/10 Volumteil der gleichen Lösung zugesetzt und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Das Konjugat wird unter Vakuumdialyse gegen PBS dialysiert und auf ca. 0,5 ml konzentriert und anschließend auf einer Sephadex-G-200 (Fa. Pharmacia) Säule (1,0 x 50 cm) fraktioniert. Die Fraktionen (ca. 0,5 ml Volumen) werden auf ihren Anteil an Enzymaktivität und Antikörper getestet und die Fraktionen, die gleichzeitig hohe Ig-Konzentration und hohe Enzymaktivität aufweisen, zusammengefaßt.

Beispiel 9

Nachweis und Bestimmung von Metastasen in Lymphgewebe

9.1 Solubilisierung von CK 20-Proteinen, vorzugsweise deren α -helikale Mittelstücke

Es wird zunächst das Feuchtgewicht des Lymphknotengewebes ermittelt. Das Gewebe wird im dreifachen Volumen — bezogen auf das Feuchtgewicht — einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) (10 mmol/l Natriumphosphat pH 7,4, 150 mmol/l Natriumchlorid) mit Hilfe eines Messerhomogenisators bis zur breiartigen Konsistenz zerkleinert (es wird der Einsatz eines Polytron-Homogenisators der Firma Kinematica, Luzern/Schweiz empfohlen). Das Homogenat wird mit Chymotrypsin inkubiert.

Zu diesem Zweck wird Chymotrypsin verwendet, das zuvor an eine Matrix (CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Fa. Pharmacia,

Freiburg) gebunden worden ist: 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B werden 15 min in 1 mmol/l HCl gequollen (Gelvolumen ca. 3,5 ml/g) und mit insgesamt 200 ml 1 mmol/l HCl gewaschen. Die Salzsäurelösung wird abgesaugt und das Matrixmaterial mit 5 ml Kopplungspuffer (0,5 mol/l NaCl, 0,1 mol/l NaHCO₃, pH 8,0) gewaschen. 10 mg Chymotrypsin werden in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und mit dem Matrixmaterial in Kopplungspuffer 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Verbliebene, nicht abgesättigte Kopplungsstellen werden danach durch Zusatz von 5 ml 0,2 mol/l Glycinlösung (pH 8,0) blockiert. Anschließend wird das Gelmaterial mit einem Überschuß an Kopplungspuffer (ca. 50 ml) und 10 ml Acetatpuffer (0,5 mol/l NaCl, 0,1 mol/l Natriumacetat, pH 4,0) gewaschen. Unter diesen Bedingungen werden ca. 60% des eingesetzten Chymotrypsins gebunden, d. h. das Sepharose 4B-Gel enthält 1,7 mg/ml gekoppeltes Chymotrypsin. Zur besseren Handhabung wird das Gel zweifach in PBS verdünnt (Chymotrypsin-Konzentration 0,85 mg/ml).

Dem Gewebebrei wird Chymotrypsin (EC 3.4.21.1 aus Rinderpankreas, z. B. von der Fa. Sigma, München) im Verhältnis 1 : 100 (berechnet auf das Feuchtgewicht des Gewebes) zugesetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 30°C (Vorzugsweise im Thermoblock, eventuell im Wasserbad). Durch Einstellen des Homogenats in Eis für 5 min wird die Abdaureaktion nach 30 min gestoppt. Das Homogenat wird 30 min bei 2×10^4 g zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand sofort abgenommen; das gekoppelte Chymotrypsin befindet sich im Sediment.

Unter diesen Bedingungen werden 80 bis 95 Gew.-% des Materials der α -helikalen Mittelstücke in noch identifizierbarem Zustand aus den CK 20-Proteinen in die Überstandsfraction freigesetzt und einige intakte CK 20-Proteine befinden sich ebenfalls in einem löslichen Stadium.

9.2 Ermittlung und Bestimmung des Vimentingehaltes

Im zentrifugierten Überstand wird Vimentin immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erstes Anti-Serum, GP-8, als Fänger-Antikörper, die gegen das α -helikale Mittelstück gerichtet sind, und ein zweiter monoklonaler Antikörper VIM-3B4 als Detektor-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des α -helikalen Mittelstückes, das von den ersten Epitopen unabhängig und verschieden ist, gerichtet ist. Der Fänger-Antikörper (GP 8) wird in einer Konzentration von 10×10^{-6} g/ml, gelöst in 50 mmol/l NaHCO₃ (pH 9,6), auf Mikrotiterplatten beschichtet (150×10^{-6} l pro Vertiefung). Für die Standardkurve wird gereinigtes Vimentin-Fragment in Konzentrationen von 10 ng/ml bis 500 ng/ml (gelöst in Puffer: 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,05% Tween 20) verwendet. Zur Messung der Vimentin-Konzentration im zentrifugierten Überstand wird dieser 1 : 100 bis 1 : 500 mit dem letztgenannten Puffer verdünnt. Der mit Peroxidase markierte Detektor-Antikörper VIM 3B4 wird mit Puffer (150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄, pH 7,4, 1% Rinderserumalbumin, 0,05% Tween 20) auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^{-6}$ g/ml verdünnt und mit 150×10^{-6} l pro Vertiefung eingesetzt. Als Substrat wird o-Phenylendiamin oder ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6))) verwendet. Der so erhaltene Vimentinwert dient dann als Bezugsgröße für die quantitative Auswertung der weiteren Meßergebnisse.

9.3 Bestimmung der Cytokeratine und Ermittlung der Cytokeratingehalte

Im zentrifugierten Überstand werden die vorhandenen Cytokeratine immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erster monoklonaler Antikörper K₅ pan 1–8, der sogenannte Fänger-Antikörper, der gegen ein erstes, für die Cytokeratine 1 bis 8 typisches Epitop gerichtet ist. Der Fänger-Antikörper K₅ pan 1–8 wird in einer Konzentration von 2×10^{-6} g/ml, gelöst in 50 mmol/l NaHCO₃ (pH 9,6), auf Mikrotiterplatten beschichtet (150×10^{-6} l pro Vertiefung). Für die Standardkurve werden z. B. die gereinigten Cytokeratin-Fragmente in den Kombinationen Cytokeratin 8 : 18 und 8 : 20 in Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml (gelöst in Puffer: 150 mmol/l NaCl, 100 mmol/l Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,05% Tween 20) verwendet. Als Peroxidase-gekoppelte Detektor-Antikörper werden z. B. K₅ 18–27 IV und K₅ 18-9B1 (für Cytokeratin 18 Fragmente) und IT-Meerschweinchen Antiserum (für Cytokeratin 20 Fragmente) eingesetzt. Zur Messung der Cytokeratin-Konzentration im zentrifugierten Überstand wird dieser 1 : 100 mit Puffer (150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,05% Tween 20) verdünnt.

Zur Standardisierung werden bekannte Mengen des nach Beispiel 7 gewonnenen Cytokeratin-Standards dem Sandwich-ELISA unterworfen. Die Enzymaktivität, die der Konzentration eines jeden standardisierten Cytokeratins entspricht, wird gegen die Konzentration aufgetragen, um eine Standard Kurve zu erhalten, von der die Konzentration unbekannter Mengen eines jeden Cytokeratins interpoliert werden kann.

Das Ausmaß von Karzinom-Metastasen kann ausgedrückt werden durch das Verhältnis des bestimmten Cytokeratins und des gemessenen Vimentins in der Gewebeprobe.

Beispiel 10

Quantitative Bestimmung von Cytokeratin 8 : 20 im Sandwich-ELISA auf Mikrotiterplatten

10.1 Beschichten der Mikrotiterplatten

In jede Vertiefung werden $0,2 \times 10^{-6}$ g Fänger-Antikörper K pan 1 - 8 (gelöst in $100 - 150 \times 10^{-6}$ l 50 mmol/l Natriumcarbonatpuffer pH 9,6) pipettiert. Die Platte wird abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

10.2 Waschen und Blockieren

Die überschüssige Antikörperlösung aus jeder Vertiefung wird durch Absaugen entfernt. In jede Vertiefung werden $3 \times$ hintereinander 200×10^{-6} l Waschpuffer (PBS-Tween: 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 0,05% Tween 20) pipettiert und durch Umdrehen der Platte entfernt. Restfeuchtigkeit wird durch leichtes Ausklopfen der Platte auf mehrere Lagen Papierhandtücher entfernt.

Jede Vertiefung wird mit 200×10^{-6} l Abblockpuffer (150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1% Rinderserumalbumin, 5% Saccharose; bei längerer Aufbewahrungszeit werden außerdem 0,01% Thimerosal zugefügt) gefüllt und mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

10.3 Inkubieren mit Antigen bzw. Serumproben

Standardprotein des Cytokeratin 8 : 20, gewonnen nach Beispiel 7 in Konzentrationen zwischen 5 ng/ml und 500 ng/ml (abhängig vom jeweiligen Detektor-Antikörper) wird in Kontrollserum (Monitrol von Merz & Dade oder Kontrollogen L und LU von Behring) aufgenommen. Das Kontrollserum wird in einer Verdünnung von 1 : 10 und 1 : 100 eingesetzt. Je Vertiefung werden 100×10^{-6} l Standardproteinlösung oder Serumproben (1 : 10 und 1 : 100 verdünnt) pipettiert und 90 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird $4 \times$ mit 200×10^{-6} l Waschpuffer (PBS-Tween, wie oben angegeben) gewaschen.

10.4 Inkubation mit Detektor-Antikörper

Mit Peroxidase gekoppelter Detektor-Antikörper (CK 20-Meerschweinchen-Antiserum) wird in Puffer (150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% Rinderserumalbumin) verdünnt (die optimale Konzentration liegt bei 0,2 - 0,5 U/ml), davon in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100×10^{-6} l pipettiert und 90 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird $2 \times$ mit 200×10^{-6} l Waschpuffer (PBS-Tween, wie oben angegeben) und $4 \times$ mit 200μ l destilliertem Wasser gewaschen.

10.5 Substratreaktion

Für eine Mikrotiterplatte wird 1 Substratablette (10 mg) o-Phenylendiamin (Fa. Sigma) und 10×10^{-6} l 30% H_2O_2 entweder in 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) oder in Citrat-Phosphat-Puffer (0,0347 mol/l Citronensäure, 0,0667 mol/l di-Natriumhydrogenphosphat; pH 5,0) gelöst (bei Verwendung von Citrat-Phosphat-Puffer erhält man höhere Absorptionen). In jede Vertiefung werden 100×10^{-6} l Substratlösung (auf Raumtemperatur temperiert) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird abgedeckt, um die Reaktion vor Lichteinwirkung zu schützen (mit Alufolie o. ä.) und solange inkubiert (15 - 30 min), bis sich eine entsprechende Farbtintensität entwickelt hat.

10.6 Abstoppen der Enzymreaktion

Durch Zugabe von 50×10^{-6} l 12,5%iger H_2SO_4 -Lösung wird die Reaktion der Peroxidase gestoppt. Bei quantitativen Bestimmungen ist zu beachten, daß für Standardprotein und Testserum nach der gleichen Zeit abgestoppt wird.

10.7 Auswertung

Die Mikrotiterplatten werden bei 492 nm in einem ELISA-Photometer durchgemessen.

Beispiel 11

In jede Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte (z. B. M 129A, Dynatech, Plochingen) werden 10 μ g Standardprotein (zu Filamenten rekonstituiertes Cytokeratin 20 und Cytokeratin 8 aus einer Stammlösung von 0,5 mg/ml in 4 mol/l Harnstoff, 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,6, 2 mmol/l Dithioerythrit, 5 mmol/l EDTA), gelöst in

- 100 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Natriumphosphat pH 7,4) pipettiert und 16 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach werden die Vertiefungen entleert, 1 × mit je 200 µl PBS gewaschen und nicht abgesättigte Bindungsstellen durch 1 h Inkubation bei RT mit 100 µl einer 1% BSA-Lösung (Rinderserumalbumin, gelöst in PBS) abgeblockt. Anschließend werden die Vertiefungen 3 × mit je 200 µl Waschlösung (0,05% Tween 20, gelöst in PBS) gewaschen, mit 100 µl Patientenserum (1 : 500 in PBS verdünnt) 1 h bei RT inkubiert, 3 × mit je 200 µl Waschlösung gewaschen und zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Human-IgM Antiserum (Rabbit anti-human Ig, µ-chain specific; Dako P 322) sowie zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper mit einem Peroxidase gekoppelten Anti-Human IgG Antiserum (Rabbit anti-human Ig, gamma-chain specific; Dako P 214) 1 : 1000 in einer 0,1% BSA-Lösung (in PBS) 1 h bei RT inkubiert. Nach 3 × mit je 200 µl Waschlösung und 2 × mit je 200 µl Aqua destillata Waschungen werden in jede Vertiefung 100 µl Substratlösung (10 mg o-Phenylendiamin, 10 µl H₂O₂ 30% in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer: 0,0347 mol/l Citronensäure, 0,0667 mol/l di-Natriumhydrogenphosphat; pH 5,0) pipettiert. Unter Lichtausschluß wird 10–30 min (je nach Farbintensität) entwickelt, die Enzymreaktion durch Zusatz von 50 µl 12,5% H₂SO₄-Lösung gestoppt und das umgesetzte Substrat bei 492 nm Wellenlänge mit Hilfe eines ELISA-Photometers gemessen. Zur Standardisierung werden parallel Vergleichsseren mit niedrigem, mittlerem und hohem Titer an Cytokeratin 20 Autoantikörpern gemessen.

Beispiel 12

- Immunhistochemische Lokalisierung von CK 20 (Protein IT) in Normal- und Tumorgewebe des Menschen

Die Untersuchungsmethoden wurden entsprechend bekannten Verfahren, wie sie z. B. in Beispiel 6 zitiert sind, durchgeführt.

1. Normalgewebe

Epithelien		
30	Magenschleimhaut (foveoläres Epithel)	+++
	Dünndarmschleimhaut	+++
	Dickdarmschleimhaut	+++
	Urothel	+++
	Merkelzellen	+++
35	Gallenblasenschleimhaut	+
	Thymusretikulum	+
	Prostata	+
	Leber	—
	Pankreas	—
40	Niere	—
	Epidermis	—
	Schweißdrüsen	—
	Talgdrüsen	—
	Brustdrüse	—
45	Mundspeicheldrüse	—
	Mundschleimhaut	—
	Oesophagus-Schleimhaut	—
	Schilddrüse	—
	Lunge	—
50	Mesothel	—
	Uterus	—
	Eileiter	—
	Nebenhoden	—
55	Nicht-epitheliale Gewebe: Sämtliche negativ	

60

65

ratin, dadurch gekennzeichnet, daß man gereinigtes CK 20 und ein gereinigtes basisches Cytokeratin aus der Gruppe der Cytokeratine 1 bis 8 im equimolaren Verhältnis gemeinsam in einem harnstoffhaltigen Puffer löst und die Mischung zuerst gegen einen Harnstoff und DTT enthaltenden Puffer, dann gegen einen Puffer ohne Harnstoff dialysiert.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man nachfolgend den gebildeten Cytokeratinkomplex proteolytisch spaltet.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die proteolytische Spaltung mit Chymotrypsin in einem Enzym zu Substratverhältnis von 6 : 1000 bis 10 : 1000 und Verdauungszeiten zwischen 30 und 60 Minuten durchführt.

13. Verfahren nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als basisches Cytokeratin CK 8 verwendet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gereinigtes CK 20 verwendet.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man die Proteine in einem 8,5 bis 10 mol/l Harnstoff und 1,5 bis 3 mmol/l DTT enthaltenden Puffer löst und die erste Dialyse gegen einen 3,5 bis 4,5 mol/l Harnstoff und 1,5 bis 3 mmol/l DTT enthaltenden Puffer durchführt.

16. Verfahren zur Herstellung von für CK 20 spezifischen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Immunisierung gereinigtes CK 20 einsetzt und nach an sich bekannten Methoden dann polyklonale oder monoklonale Antikörper erzeugt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gereinigtes CK 20 einsetzt.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern zur Isolierung von monospezifischen Antikörpern die Immunglobulinfraktion einer Immunpräzipitation und Abtrennung von gegen andere Cytokeratine gerichteten Antikörpern oder/und einer Immunpräzipitation und Abtrennung der für CK 20 spezifischen Antikörper unterwirft.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Immunpräzipitation und Abtrennung der für CK 20 spezifischen Antikörper durch Inkubation der erhaltenen Immunglobulinfraktion mit einer festen Phase, an die CK 20 gekoppelt wurde, durchführt.

20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Immunpräzipitation und Abtrennung von gegen andere Cytokeratine gerichteten Antikörpern durch Inkubation der erhaltenen Immunglobulinfraktion mit einer festen Phase, an die elektrophoretisch aufgereinigte Cytokeratine 8, 18 und 19 oder Gesamtprotein aus diese enthaltenden Zellen gekoppelt wurde, durchführt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß mehrfach Immunpräzipitationsschritte durchgeführt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als feste Phase Nitrozellulosestreifen verwendet.

23. Verwendung von Antikörpern, die nach einem der Ansprüche 16 bis 20 hergestellt wurden, zur immunologischen Identifizierung von CK 20 oder seinem durch proteolytische Spaltung erhaltenen α -helikalen Mittelstück auf Gewebeschnitten, in Gewebemogenaten und in Körperflüssigkeiten.

24. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Gewebeprobe ein Homogenat gebildet wird, die in dem Homogenat enthaltenen Intermediärfilament-Proteine proteolytisch gespalten werden, und die daraus freigesetzten α -helikalen Mittelstücke in der löslichen Phase abgetrennt werden und mit Hilfe von Antikörpern identifiziert und quantitativ bestimmt werden.

25. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß in Körperflüssigkeiten wie Blut, Blutserum und Urin die darin enthaltenen löslichen Intermediärfilament-Proteinfragmente mit Hilfe der Antikörper immunologisch identifiziert und quantitativ bestimmt werden.

26. Verwendung eines Standardproteinmaterials nach einem der Ansprüche 8 oder 9 oder hergestellt nach einem der Ansprüche 10 bis 15 zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CK 20 im Blut oder Serum.

27. Verfahren zur Unterscheidung der Karzinome des Gastrointestinaltraktes, der Blase und Merkel-Zellen von anderen Tumoren, speziell anderen Karzinomen oder Nachweis der zellulären Abstammung von Metastasen durch Untersuchung auf das Vorhandensein von CK 20 im zu untersuchenden Gewebe mit Hilfe von für CK 20 spezifischen Antikörpern.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

Fig. 1

IT-A EKMFMQHLNDXLASYL
ck 14 VGSEKVTMQHLNDRLASYLQKV
ck 16 VGSEKVTMQHLNDRLASYLQKV
ck 15 SGNEKITMQHLNDRLASYLQKV
ck 19 AGNEKLTMQHLNDRLASYLQKV
ck 13 TGNEKITMQHLNDRLASYLEKV
ck 10 SGNEKVTMQHLNDRLASYLQKV
ck 18 IONEKETMQSLNDRLASYLQKV

IT-B EVOIKOWYETNAPRAG RDYSAYYROIE
ck 14 EVKIRDWYORORP AEI KDYSAYFKTIE
ck 16 EVKIRDWYORORP SEI KDYSAYFKTIE
ck 15 EVKIRDWYOKOTP ASP ECDYSOYFKTIE
ck 19 EVKIRDWYOKOGP GPS RDYSHYYTIO
ck 13 EVKIRDWHLKOSP ASP ERDYSYYKTIE
ck 10 EGKIKEWYKXGN SHOGEPADYSKYKTID
ck 18 ESKIREHHEKKGP OV RDWSHYFKTIE

IT-C EYNAAPGLNLGVIMNE
ck 14 VNVEMDAAPGVOLSRILNEMRD
ck 16 VNVEMDAAPGVOLSRILNEMRD
ck 15 VNVEMDAAPGVOLTRILAEMRE
ck 19 VSVEYDSAPGTOLAKILSDMRS
ck 13 VNVEMDATPGIDLTRVLAEMRE
ck 10 VNVEMNAAPGVOLTOLLNMRS
ck 18 LTVEVDAPKSODLSIIMADIRA

IT-D EXELOSKLSVKATOL
ck 14 ONLEIELOSOLSMKAS LENS
ck 16 OGLEIELOSOLSMKAS LENS
ck 15 OELEIELOSOLSMKAG LENS
ck 19 OGLEIELOSOLSMKAA LEDT
ck 13 OGLEIELOSOLSMKAG LENT
ck 10 OALEIELOSOLALKOS LEAS
ck 18 OSLEIRLDRMRNLKAS LENS